

# 研 究 報 文

## 二・三食品の褐変現象について

足 立 晃 太 郎\*  
 岩 見 敏 子\*\*  
 亀 井 光 子\*\*\*  
 霊 山 満 佐 子\*\*\*

### 諸 論

食品が褐変する現象は、さつまいもの乳液の褐変、りんご、梨、馬鈴薯の切口の褐変、牛蒡、ずいき、ふき等の調理の際におけるアク、又、みそ、醤油、パンの着色等の如く日常生活において常に経験する現象である。これら食品の褐変現象を惹起する因子については従来より種々の研究がなされて来た。

りんご、梨の褐変は Tannin (Polyphenol) の酸化によつて起るものであり、りんご、梨の若芽より L-Epicatechin<sup>(1)</sup>の分離、りんごの果皮より Quercetin<sup>(2)</sup>, Hyperin 及び Idein<sup>(3)</sup>の分離、果実より Chlorogenic acid<sup>(4)</sup>が得られ、果肉中に Tannin が存在すること、果肉褐変の基質は L-Epicatechin<sup>(5)</sup> 及び Chlorogenic acid<sup>(6)</sup>であることが明らかにされている。又、桃の果実からは D-Catechin<sup>(7)</sup>及び Coffetannin<sup>(8)</sup>が分離されている。馬鈴薯の褐変は Tyrosinase によるものであり、既に植物組織学的、酵素化学的手法により Tyrosinase が明らかにされているが、酵素的、非酵素的に変化を起す成分の分離検索が行なわれ、馬鈴薯中に遊離する L-Tyrosine 及び Chlorogenic acid<sup>(9)</sup>を分離して、これが馬鈴薯褐変の主要因子であることを究明している。又、みそ、醤油、パンの褐変は、カラメル形成及び Maillard<sup>(10)</sup>反応によるものである。その他、茶葉からは9種の Catechin類及び Gallic-acid<sup>(11)</sup>が検出され、果実類の非酵素的褐変現象についての多方面よりの研究がなされている。

著者等は試料として牛蒡、ずいき、ふきの三種をとあげ、これら三種食品の褐変因子を追求するため、種々の褐変因子より主要な5因子即ち

- 1 Tannin の存在
- 2 酸化酵素の存在
- 3 Maillard 反応
  - a 糖
  - b アミノ酸

### 4 光線及び空気 (O<sub>2</sub>)

### 5 Ascorbic acid

について実験を行うこととした。

Tannin, 糖, アミノ酸については定性反応と Paper chromatography (P.C.) を同時に試み、酵素については定性反応のみを行った。又、光線については、可視光線、紫外線、遮光の各条件について、空気については室内放置及び真空デシケーター中の各々の条件下における色調の変化を観察した。尚アスコルビン酸については各試料共に100グラム中の含有量が少量であるため、実験を省略した。

### 実 験 の 部

#### [1] 試料

牛蒡 市販品  
 ずいき 奈良県山辺郡山添村附近で栽培されたもの  
 ふき 奈良県山辺郡山添村附近で栽培されたもの

#### [2] 実験

##### § 1 Tannin<sup>(11)</sup>

##### (イ) 沈澱及び呈色反応

試料を水洗し、細切して3~4分間ミキサーにかけ汙過する。この汙液を供試液とした。

- (a) ゼラチン液による沈澱: 0.5%のゼラチン及び10%の食塩を含む液を、試液に等量加えると白色沈澱を生ずる。カテキンでは混濁を生ずるのである。
- (b) 金属類による沈澱: 試液に等量の10%醋酸鉛溶液を加える。鉛塩は白色沈澱で醋酸に溶解するものとししないものがある。
- (c) 重クロム酸塩による呈色: 重クロム酸加里飽和液を加えると、黒褐色の沈澱を生ずる。
- (d) 鉄塩による呈色: 鉄塩溶液 (第二塩化鉄の1%溶液) を加えると、暗緑、暗青乃至黒色となり、沈澱を生ずる。

\* 本学教授    \*\* 昭和35年度食物科卒業生    \*\*\* 本学副手

(e) 臭素水による呈色：臭素水を滴下すると黄褐～赤褐色となる。

(f) 濃硫酸による呈色：濃硫酸を加えると、黄褐～紫紅色となる。

(g) 濃硫酸による呈色：濃硫酸を加えると、黄褐～

赤褐色となり沈澱を生ずる。

### 結果及び考察

以上の結果は第1表の如くである。+は Tannin の存在を認めたものである。

第1表 Tannin の沈澱及び呈色反応

試料	ご ぼ う	ず い き	ふ き
定性反応			
ゼラチン液による沈澱	不 明	+(わずかに白濁)	+(白 濁)
金属類による沈澱	卅 (黄褐色沈澱)	卅 (白色沈澱)	卅 (白色沈澱)
重クロム酸塩による呈色	+(わずかに褐色)	+(茶 褐色)	不 明
鉄塩による呈色	+(暗 青 色)	+(暗 青 色)	+(暗 青 色)
臭素水による呈色	+(黄 褐 色)	+(橙 黄 色)	+(黄 褐 色)
濃硫酸による呈色	+(茶 褐 色)	+(赤 褐 色)	+(黄 褐 色)
稀硫酸による呈色	不 明	+(赤 褐 色)	不 明

(ロ) P.C. による Tannin の分離検出<sup>(12)</sup>

試料を水洗、細切し、2～3倍量の氷冷メタノールを加えてミキサーで磨砕し濾過する。この濾液を炭酸ガス気流中で 50°C にて減圧濃縮し、メタノールを溜去して得たシラップを検液とする。濾紙は東洋濾紙 No. 50 (2×40cm) を使用、展開剤は N-Butanol ; 酢酸 : 水 = 5:2:6、発色剤は 0.1% FeCl<sub>3</sub> 及び 1% KCN を噴霧する一次元上昇法によった。

結果及び考察、結果は第2, 3, 4表のごぼう、ずいき、ふき。よりそれぞれ2個のスポットを得、Tannin の分別決定は、Tannin extract との 対称試験 及び Rf 値の比較によった。

第2表 牛 蒡

Spot No.	I	II
Rf 値	0.83	0.74
標準 Rf 値	0.82	0.75
呈色 { 0.1% FeCl <sub>3</sub> 1% KCN	Dark blue Brown	Dark blue Brown
Tannin の種類	L-Epicatechin gallate	Gallic acid

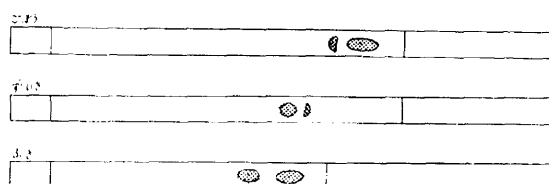
第3表 ず い き

Spot No.	I	II
Rf 値	0.72	0.67
標準 Rf 値	0.75	0.67
呈色 { 0.1% FeCl <sub>3</sub> 1% KCN	Dark blue Brown	Dark blue Brown
Tannin の種類	Gallic acid	L-Epicatechin

第4表 ふ き

Spot No.	I	II
Rf 値	0.84	0.71
標準 Rf 値	0.82	0.75
呈色 { 0.1% FeCl <sub>3</sub> 1% KCN	Dark Blue Brown	Dark Blue Brown
Tannin の種類	L-Epicatechin gallate	Gallic acid

第 1 図



(ハ) 確 認

Paper chromatogram により牛蒡、ずいき、ふきいずれにも Gallic acid の存在が推定され、その他、牛蒡及びふきにそれぞれ、L-Epicatechin Gallate を、ずいきに L-Epicatechin の存在が推定されたので、これを明らかにするため更に次の実験を行った。

a) Gallic acid の確認

① P.C. にて Gallic acid の純粋物との一致をみた。

② 呈色反応 (HCl-ホルモル法による)<sup>(14)</sup>  
試料浸出液に等量の HCl-Formalin 試薬<sup>(15)</sup> (35% HCl 100cc, 30% Formalin 20cc, 水 50cc) を加え2時間放置後、濾過し、炭酸ナトリウムにて微アルカリ性となし、これに燐モリブデン酸溶液を加えると、牛蒡、ずいき

ふき共に鮮明な青色を呈した。これより Gallic acid であることを確認した。

- b) Catechin の確認(結晶として分離) 試料を水洗細切し、2~3倍量の氷冷メタノールを加えミキサーにて磨砕後、汙過する。汙液に少量の醋酸鉛飽和液を加えて不純物を含む沈澱を汉去し、この汉液に再び醋酸鉛飽和液を加えて沈澱させる。この沈澱を少量の水に溶解して10%  $H_2SO_4$  にて分解し炭酸ナトリウム飽和液にて中和する。これを  $CO_2$  気流中にて減圧濃縮し、醋酸エチルを加えて振盪し、50°Cにて醋酸エチルを脱水濃縮後クロロホルムを滴下して氷室に貯える。Tanninは一般に水、温水、メタノール、エタノール、エーテル、醋酸エチルによつて抽出されるが、メタノール及び温水にて数回づつ実験を試みたにもかかわらず、牛蒡、ずいき、ふき共に結晶を得るに至らなかった。これは、Tannin が酸化されやすいこと、又、高分子化合物であるために純粋な結晶としては得がたいこと、牛蒡、ずいき、ふきのCatechin 含量が少量であるために結晶にまで至らなかった等の理由によるものと思われる。

## § 2 酸化酵素

試料を水にて抽出後、汉過し、その汉液を37°Cにて2時間保持し、これを酵素液とした。

- (a) パーオキシダーゼ：ピロガロール5g を20°C、2000ccの水に溶解し、これに0.5%過酸化水素水10cc及び適当に稀釈した酵素液10ccを加えると、液は直ちに黄色に変じ沈澱を生ずる。
- (b) チロシナーゼ：酵素液を中性となし、少量のチロシンを加えて37°Cに24時間保持すれば、チロシナーゼの存在する時は橙黄色~暗褐色~黒色の変化を示すが、牛蒡、ずいき、ふき共に変化をみなかつた。
- (c) 過酸化水素(グアヤック反応)：3ccのグアヤックチンキ(0.3gを10ccのアルコールに溶解したもの)に3%過酸化水素水2ccを加え、これに酵素液を加えると、両者の接触面は、グアヤコン酸の生成により藍色を呈した。
- (d) カタラーゼ( $KMnO_4$ 滴定法による)：5~10ccの酵素液をとり、1%の過重なる過酸化水素水20ccを注加し、これに10%  $H_2SO_4$  10ccを加えて酸性となし、後30~40ccの水で稀釈し  $KMnO_4$  溶液にて滴定する。牛蒡、ずいき、ふき共に  $KMnO_4$  溶液数ccの滴下により微紅色を呈した

のでカタラーゼの存在を認めた。

## 結 果

以上の結果については次表の如くである。+は酵素の存在することを示す。

試 料	牛 蒡	ずいき	ふ き
酵 素			
パーオキシダーゼ	+	+	+
チロシナーゼ	-	-	-
過 酸 化 水 素	+	+	+
カ タ ラ ー ゼ	+	+	+

## § 3 Maillard 反応

### A 糖

炭水化物に共通なる反応、即ち、Molish 反応及びTymol 反応が陽性を示したので定性反応とP.C.により糖の分離検出を行った。

#### a) 定性反応による検出

水抽出液をもつて検液とした

##### (イ) 炭水化物共通の反応

Molish 反応

Tymol 反応

##### (ロ) 還元糖の検出反応

Trommel 反応

Fehling 反応

Picric acid 反応

##### (ハ) Ketose の検出反応

Seliwanoff 反応

##### (ニ) Pentose の定性反応

Aniline 反応

Orcinol 反応 (Bial 反応)

##### (ホ) Methyl Pentose の定性反応

検液に38% HCl 10ccとアセトン1~2ccを加え、沸騰湯煎上で加熱すれば紫色を呈する。

##### (ヘ) Glycogen の検出

試験管に検液をとり、混合試薬(ヨード：ヨードカリ：水=2:4:100)を2~3滴、滴下すれば、Glycogen の存在する時は濃褐色を呈する。後、Water bath で加熱すれば褪色し、更に冷却すれば再び濃褐色を呈する。

## 結 果

以上の結果は第5表の如くである。+は糖の存在することを示す。

第5表 定性反応による糖の検出

試料 反 応	ごぼう	ずいき	ふ き
Molish 反応	+	+	+
Tymol 反応	+	+	+
Trommel 反応	+	+	+
Fehling 反応	+	+	+
Picric acid 反応	+	+	+
Seliwanoff 反応	—	+	—
Aniline 反応	—	—	—
Orcinol 反応	—	+	+
Methylpentose	—	—	—
Glycogen	—	—	—

b) P. C.による分離検出 水抽出液をもつて検液とした。沱紙は東洋沱紙 No.50 (2×40cm), 展開剤は N-Butanol : 酢酸 : 水 = 4:1:5, 発色剤は Aniline hydrogen phthalate を用い, 一次元上昇法によつた。

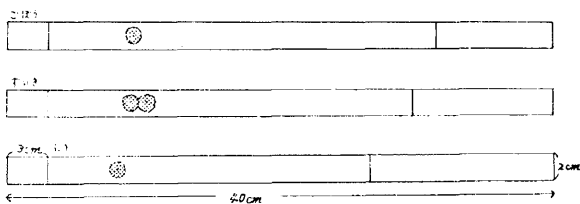
### 結果及び考察

ごぼう及びふきより各1個づつ, ずいきよりは2個のスポットを得た。

第 6 表

	Rf 値	標準 Rf 値	糖 の 種 類
ご ぼ う	0.19	0.18	D-Glucose
ふ き	0.20	0.18	D-Glucose
ず い き	0.24	0.23	D-Fructose
	0.20	0.18	D-Glucose

第 2 図



以上の如く, Paperchromatogram では牛蒡より d-Glucoseをずいきより D-Glucoseと D-Fructoseを, ふきより D-Glucose を検出したが, 定性反応より, ずいきには l-Rhamnose ふきには l-Arabinose の存在が推定される。尚, 牛蒡には多種類のイヌリンが存在することは明らかである。以上の結果は第7表の如くである。

第 7 表

牛 蒡	ず い き	ふ き
D-Glucose	D-Glucose l-Rhamnose D-Fructose	D-Glucose l-Arabinose

### B アミノ酸

Ninhydrin 反応が陽性を示したので, P, C, により, アミノ酸の分離検出を行い, 純粋物との同時展開による対称試験及び, 定性反応によつて, アミノ酸の種類を追求した。

#### a) P. C. による分離検出

水抽出液をもつて検液とした。沱紙は東洋沱紙 No. 50 (40×40cm), 展開剤は, n-Butanol : 酢酸:水=4:1:2, 発色剤は, 水飽和 n-Butanol に Ninhydrin を0.1%に溶解したものをを用い, 二次元上昇法によつた。その結果, 牛蒡より3個, ずいきより2個, ふきより1個のスポットを得たが, ふきについてのみはアミノ酸の種類を明らかにすることが出来なかった。

第8表 P. C.によるアミノ酸の分離検出

	Spot No.	Rf 値	標準Rf値	アミノ酸の種類
ご ぼ う	I	0.35	0.35	Threonine
	II	0.31	0.30	Oxyproline
	III	0.26	0.25	Histidine
ず い き	I	0.34	0.35	Threonine
	II	0.31	0.31	Oxyproline

#### b) 定性反応による検出

(イ) アミノ酸の一般反応: Ninhydrin 反応

(ロ) Arginine: 坂口反応

(ハ) Histidine: 検液を氷冷しつつ, Sulfonic acid を  $\frac{N}{10}$  HCl に 0.1%に溶解したものと 5%亜硝酸水溶液を同量混合し, この液1ccを氷冷せる検液に加えると1~2分後, 橙黄~赤色となる。

(ニ) Methionin: 検液を 3N NaOH にてアルカリ性となし, これに 1cc の 1% Sodium nitroprusside 溶液を加え 40°Cに5分間加熱後氷冷し, 振盪しながら 6N HCl を徐々に注ぐと赤色を呈する。

(ホ) Proline: 試料の醋酸溶液に1ccの Isatine を加え, 沸騰湯浴中にて5分間加熱すると, 青色を呈する。Oxyproline 及び他のアミノ酸もわずかに呈色するが, それらは数時間で消失する。

(ヘ) Tyrosin: 検液に, 1cc の 0.2% Nitrore β-Naphthol アルコール溶液を加えて加熱しその熱溶液に濃硝酸を数滴加えれば赤紫色を呈す。

(ト) Tyrosine, Tryptophane, Phenylalanine:

## Xanthoprotein 反応

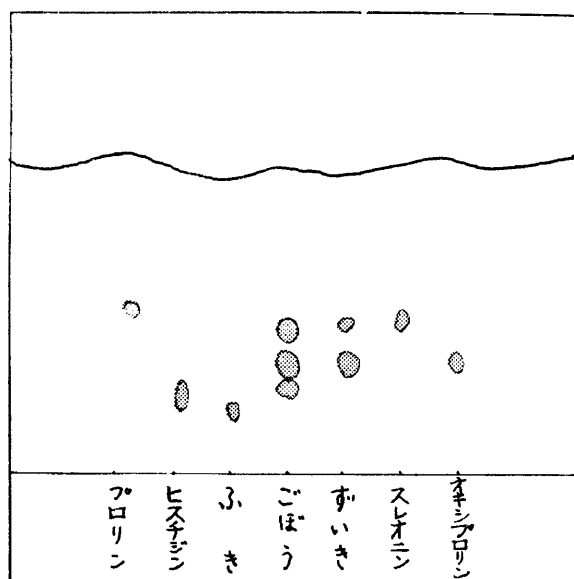
## (チ) Tryptophane : Acree-Rosenheim 反応

以上の結果は第8表の如くである。+はアミノ酸の存在することを示す。

第 9 表

試料	ごぼう	ずいき	ふき
反 応			
(イ) Ninhydrin 反応	+	+	+
(ロ) Arginine	-	-	-
(ハ) Histidine	+	-	-
(ニ) Methionine	-	-	-
(ホ) Proline	-	-	+
(ヘ) Tyrosine	-	-	-
(ト) Tyrosine Tryptophane Phenylalanine	-	-	-
(チ) Tryptophane	-	-	-

第 3 図



ふきの Paper chromatogram における, 1個の不明のスポットは, 定性反応よりフロリンではないかと思われる。

ごぼう, ずいき, ふきの糖及びアミノ酸は, 本実験においては, 水抽出液で試みたためか, 多くの種類を検出することは出来なかった。Maillard 反応はアミノ酸及び糖の種類, 反応液の pH, 温度等の条件によって影響をうけるものであるが, アミノ酸においては Glycine の反応が最も早く, その他のアミノ酸では大差がなかった。糖においては Pento-

以上の Maillard 反応促進条件と, 本実験の結果を比較検討するに, 糖においては, Maillard 反応を促進する pentose 及び Hexose の存在を認めるが, アミノ酸においては, Glycine の存在を認めず, 室温18°C において実験を行ったにもかかわらず, 三試料共に褐変現象をみた事実より, ごぼう, ずいき, ふきの褐変には, Maillard 反応は殆んど影響を及ぼさぬものと思われる。即ち, ごぼう, ずいき, ふきの主要褐変物質は糖及びアミノ酸ではないと考えられる。

## §4 光線及び空気

試料を水洗, 細切し直ちに浸水して, 光線については(1)室内に放置して可視光線の影響を, (2)殺菌灯を照射して紫外線の影響を, (3)暗所に保存して遮光した場合を, 又, 空気 (O<sub>2</sub>) については(1)室内に放置した場合及び(2)真空デシケータ中に保存した場合, それぞれの条件について色調の変化を観察した。

## 結果及び考察

結果は第9, 10表の如くであり+は褐変したことを示す。

第9表 光線による影響

試料	可視光線	紫 外 線	遮 光
ご ぼ う	+	+	-
ず い き	-	-	-
ふ き	-	-	-

第10表 空気による影響

試 料	放 置	真 空
ご ぼ う	+	-
ず い き	-	-
ふ き	-	-

ずいき, 及びふきでは細切して浸水したのみでは, 光線についても又, 空気についても色調の変化を認めなかったが, ごぼうに褐変現象を認めたこと, 可視光線と紫外線では色調に差異があったこと, ミキサーにかけることによつては, ごぼう, ずいき, ふき共に, 著しく褐変する等の事実より, これら三試料の褐変には, 光線, 空気関係していることは明らかであると考える。

## §5 アスコルビン酸

日本食品標準成分表によれば, Vitamin C の含有量は, ごぼうでは2mg%, ずいきでは10mg%, ふきでは2mg% であり, いずれも少量であるので,

Ascorbic acid による影響は殆んどないものと考え実験は省略した。

### 総 括

食品の褐変現象に関しては、従来より多くの研究がなされている。著者等は、未だ明らかにされていないと考えられる、ごぼう、ずいき、ふきを試料としてとり上げ、これら食品の褐変因子を究明するべく本実験を行った。種々、考えられる褐変因子より主要な5因子について実験を行った。即ち、Tannin については、定性反応によりその存在を認め Paper chromatogram によって、ごぼうより L-Epicatechingallate と Gallic acid, ずいきよりは L-Epicatechin と Gallic acid. ふきよりは L-Epicatechin gallate と Ggallic acid を分離検出した。酸化酵素については、過酸化水素及びパーオキシターゼ、カタラーゼの存在を認めた。又、Maillard 反応についてはこれに関係する糖を定性反応と Paper chromatogram とにより、ごぼうからは D-Glucose, ずいきから D-Glucose と D-Fructose 及び L-Rhamnose, ふきから D-Glucose と L-Arabinose の存在を推定し、アミノ酸では定性反応及び Paper chromatogram より、ごぼうから Threonine, Oxyproline, Histidine, ずいきより Threonine, Oxyproline, ふきより Proline の存在を推定した。次に光線及び空気の影響を知るために、細切試料の色調の変化を観察したが、光線、空気ともに、ごぼうにのみ褐変が認められ、ミキサーによつては三試料ともに著しく褐変することを認めた。要約すれば次の如くである。

1. ごぼう、ずいき、ふきの褐変は、りんご、梨、茶葉の褐変と同じく、Tannin が光線、空気、酸化酵素等により酸化されて起るものである。
2. Maillard 反応は、ごぼう、ずいき、ふきの糖及びアミノ酸の種類、反応の温度、pH より考えて、これら食品の主要褐変因子ではないと考えられる。
3. アスコルビン酸は褐変促進の因子ではあるが、ごぼう、ずいき、ふきの Vitamin C 含有量が少量であるため、その影響は殆んどないものとする。

### 参 考 文 献

- (1) A. E. Bradfield, A. E. Flood, A. C. Hulme and A. H. Williams: Nature, 170, 168 (1952).
- (2) C. E. Sando: J. Agr. Research, 28, 1243 (1924).
- (3) A. C. Hulme: Biochem. J., 53, 337 (1953).
- (4) E. L. Ouerholser and W. V. Cruess: Calf. Agr. Exp. Sta. Tech. Paper, 7, 40 (1923).
- (5) 中林: 日農化, 27, 813 (1953)
- (6) G. Johnson et. al.: Food Research, 16, 169 (1951).
- (7) D. S. Van Fleet: Bot. Rev., 18, 354 (1952).
- (8) 小幡, 坂村: 日農化, 17, 766 (1953).
- (9) 大島, 中林, 西田: 日農化, 26, 368 (1952).
- (10) E. R. Stadtman: Advances in Food Research, 1, 325 (1948).
- (11) G. Klein: Handbuch der Pflanzen Analyse, 2, 344 (1932).
- (12) 大島, 中林, 石橋: 日農化, 28, 264 (1954).
- (13) 大島, 中林, 西田: 日農化, 26, 377 (1952).
- (14) 大島, 中林, 西田: 日農化, 26, 378 (1952).
- (15) 辻村: Sci. Paper Inst. Phys. Chem. Res., 38, 490 (1941).